

IDS Filed 7/22/08  
in 10/528,240

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-137894

(43)Date of publication of application : 14.05.2003

(51)Int.Cl. C07F 9/09  
 A61K 31/661  
 A61P 9/00  
 A61P 9/10  
 A61P 11/00  
 A61P 27/02  
 A61P 29/00  
 A61P 35/00

(21)Application number : 2001-340853

(71)Applicant : NATIONAL INSTITUTE OF  
 ADVANCED INDUSTRIAL &  
 TECHNOLOGY  
 MARUHA CORP

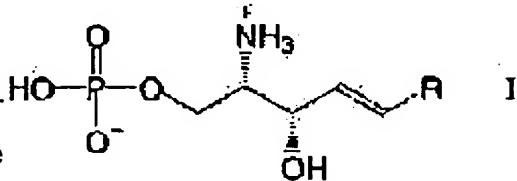
(22)Date of filing : 06.11.2001

(72)Inventor : TAMAI TADAKAZU  
 NISHIKAWA MASAZUMI  
 MURAKAMI TEIICHI(54) PHOSPHORYLATED AMINO ALCOHOL, METHOD OF PRODUCING THE SAME AND  
 USE THEREOF

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a medicine that  
 antagonizes Edg (endothelial differentiation gene)  
 receptor.

SOLUTION: This medicine is a threo type (2S, 3S)  
 phosphorylated amino alcohol represented by general  
 formula I [wherein R is a straight-chain or branched  
 $\text{CH}_3\text{C}_n\text{H}(2n-2m)-$  (n is an integer of 2-19; m is an integer  
 of 0-3) which may be substituted or an aryl which may be  
 substituted] or pharmacologically acceptable salts  
 thereof.



(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-137894

(P2003-137894A)

(43)公開日 平成15年5月14日 (2003.5.14)

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

C 07 F 9/09

A 61 K 31/661

A 61 P 9/00

9/10

識別記号

F I

データード(参考)

C 07 F 9/09

U 4 C 08 6

A 61 K 31/661

4 H 05 0

A 61 P 9/00

9/10

101

101

審査請求 未請求 請求項の数13 O L (全14頁) 最終頁に統く

(21)出願番号

特願2001-340853(P2001-340853)

(22)出願日

平成13年11月6日 (2001.11.6)

(71)出願人 301021533

独立行政法人産業技術総合研究所

東京都千代田区霞が関1-3-1

(71)出願人 000003274

マルハ株式会社

東京都千代田区大手町1丁目1番2号

(72)発明者 玉井 忠和

茨城県つくば市和台16-2 マルハ株式会社中央研究所内

(74)代理人 100089705

弁理士 社本 一夫 (外5名)

最終頁に統く

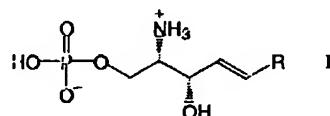
(54)【発明の名称】 アミノアルコールリン酸化合物、製造方法、及びその利用方法

(57)【要約】

【課題】 Edg (endothelial differentiation gene、血管内皮細胞分化遺伝子) 受容体へ拮抗する医薬を提供する。

【解決手段】 一般式 I

【化1】

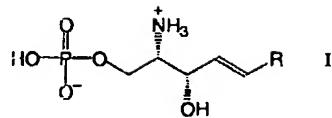


(式中、Rは、置換されてもよい直鎖状または分岐鎖状の $\text{CH}_3\text{C}_n\text{H}_{(2n-2m)}$ -(nは、2から19の間のいずれかの整数であり、mは、不飽和数を表し、0から3の間のいずれかの整数である)または置換されてもよいアリール基である)で表される、スレオ型(2S, 3S)アミノアルコール-1-リン酸化合物またはその製薬学的に許容される塩。

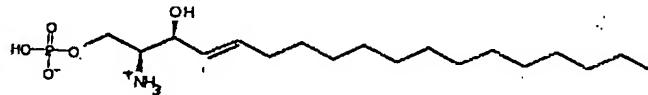
【特許請求の範囲】

【請求項1】一般式I

【化1】



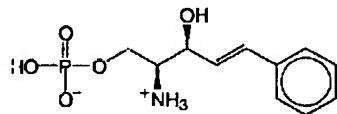
(式中、Rは、置換されてもよい直鎖状または分岐鎖状の $\text{C}_3\text{C}_n\text{H}_{(2n-2m)}$ —(nは、2から19の間のいずれかの整数であり、mは、不飽和数を表し、0から3の間のいずれかの整数である)または置換されてもよいアリール基である)で表される、スレオ型(2S, 3S)アミ



で表される、請求項1に記載の化合物またはその製薬学的に許容される塩。

【請求項4】一般式Iが下記式:

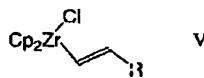
【化4】



で表される、請求項1に記載の化合物またはその製薬学的に許容される塩。

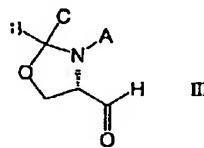
【請求項5】(1)一般式V

【化5】



(式中、Rは、置換されてもよい直鎖状または分岐鎖状の $\text{C}_3\text{C}_n\text{H}_{(2n-2m)}$ —(nは、2から19の間のいずれかの整数であり、mは、不飽和数を表し、0から3の間のいずれかの整数である)または置換されてもよいアリール基であり、Cpはシクロペンタジエニル基を表す)で表される有機ジルコニウム化合物に、ジアルキル亜鉛を作用させて調製したアルケニル化剤と、一般式IのN-保護した(S)-ホルミルオキサゾリジン化合物:

【化6】



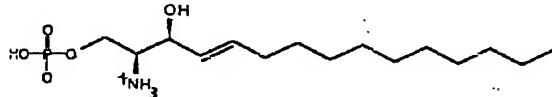
(式中AはNの保護基であり、B及びCはアルキル基である)とを反応させて、一般式IIのスレオ体(2S, 3S)を選択的に得ること。

【化7】

ノアルコール-1-リン酸化合物またはその製薬学的に許容される塩。

【請求項2】一般式Iが下記式:

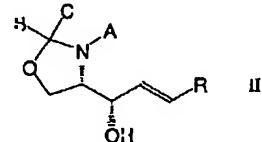
【化2】



で表される、請求項1に記載の化合物またはその製薬学的に許容される塩。

【請求項3】一般式Iが下記式:

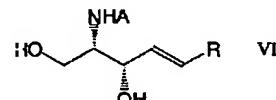
【化3】



(式中、R、A、B及びCは前記定義と同じ)

(2) 化合物IIのオキサゾリンを開環してアセタール型保護基を除去し、アミノ基が保護された一般式VIのアルコール化合物を得ること:

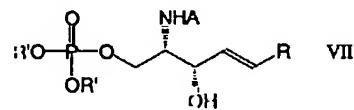
【化8】



(式中、R及びAは前記定義と同じ)

(3) 一般式VIの化合物から下記一般式VIIの1-リン酸類縁体化合物へ変換すること:

【化9】



(式中、R及びAは前記定義と同じであり、R'は低級アルキル基である)

(4) 一般式VIIの化合物のアミノ基及びリン酸基の各保護基を除去することを含む、請求項1の化合物の製造法。

【請求項6】請求項1～請求項4のいずれか1項に記載の化合物またはその製薬学的に許容される塩を有効成分として含有する、内皮分化遺伝子(Edg)受容体に拮抗する医薬。

【請求項7】循環器系疾患を治療または予防するための請求項6の医薬。

【請求項8】循環器系疾患が動脈硬化症である請求項7

の医薬。

【請求項9】ガンを治療または予防するための請求項6の医薬。

【請求項10】リウマチを治療または予防するための請求項6の医薬。

【請求項11】糖尿病性網膜症を治療または予防するための請求項6の医薬。

【請求項12】呼吸器系疾患を治療または予防するための請求項6の医薬。

【請求項13】循環器系疾患が心臓疾患である請求項7の医薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

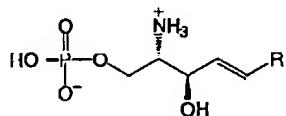
【発明の属する技術分野】本発明は新規なアミノアルコールリン酸化合物、その製造方法、及びその利用方法に関するものである。かかる化合物は内皮分化遺伝子endothelial differentiation gene (Edg)受容体に拮抗し、抗循環器系疾患性（例えば、抗動脈硬化性、抗心臓疾患性（例えば、抗不整脈性、抗心筋梗塞性）、抗リウマチ性、抗がん性、抗糖尿病性網膜症性や抗呼吸器系疾患性を示す医薬として有用である。

【0002】

【従来の技術】近年の医学・生化学分野における研究により、生体におけるスフィンゴ脂質類の重要性が明らかになってきており、スフィンゴ糖脂質は細胞間相互認識、細胞増殖調節、発生・分化の調節、感染及び細胞の悪性化等において重要な役割を果たすことが示唆されている。

【0003】一方、スフィンゴ脂質類の分解代謝産物であるスフィンゴシン-1-リン酸 (SPN-1P)

【化10】



についてはその役割が未知であったが、近年、SPN-1Pを内因性リガンドとするオーファン受容体endothelial differentiation gene (Edg)が見出され、生理作用が次第に明らかになってきた。

【0004】Edgは1990年にオーファン受容体として遺伝子がクローニングされた [Edg-1 (JBC '90, 265, p. 9308)] が、その後、Edg-1のホモログとして、Edg-3 (BBRC '96, 227, p. 608)、Edg-5 (AGR 16/H 218) (JBC '96, 135, p. 1071) が得られたものの、その生理的役割は不明だった。ところが、'98年、SPN-1PがEdg-1の内因性リガンドとなっている可能性が示唆され (Science, '98, 279, p. 1552)、その後、Edg-3、及びEdg-5もSPN-1P特異的受容体である事が示された (BBRC '99, 260, p. 263、JBC '99, 274, p. 18997)。

【0005】血管内皮細胞上のEdg-1がSPN-1Pの刺激によって、カドヘリンなど接着タンパク質をアップレギュレートし (Science, '98, 279, p. 1552)、Tリンパ球由来株化細胞が、SPN-1Pの刺激によって、in vitro疑似血管モデルでの血管層侵入を増長する (EMBO J., '98, vol. 17, No. 14, p. 4066)。また、岡島らはEdg-1、或いはEdg-3を強制発現させたCHO細胞を用い、疑似血管遊走試験を行ったところ、どちらの場合も、SPN-1P濃度依存的に遊走が促進した ('99年日本生化学会大会要旨集 p. 883)。一方、五十嵐らは、がん細胞株F10が疑似血管モデルにてSPN-1P  $10^{-8}$ ~ $10^{-6}$  Mにて濃度依存的に最大80%ほど遊走抑制を受ける事を示したが、F10細胞ではEdg-1、或いはEdg-3は殆ど発現しておらず、Edg-5が発現していた ('99年日本生化学会)。発現亞種が異なる事が原因となって、SPN-1Pが遊走抑制を示した可能性が指摘されている ('99年日本生化学会大会要旨集 p. 675, 883)。

【0006】血管平滑筋細胞 (Eur. J. Biochem. '98, 257, p. 403)、或いは気道平滑筋細胞 (Biochem. J. '99, 338, p. 643) で、どちらも、SPN-1P応答性にMAPキナーゼ活性化が観察されており、SPN-1Pが血管平滑筋増殖の方向に作用する可能性が指摘されている。

【0007】杉山らは、ラットにSPN-1Pを尾静脈経路で投与し血行動態を観察したところ、収縮期血圧、及び左心室圧時間微分の二指標の有意な低下を観察し、SPN-1Pが、in vivoにおいて、心機能低下の方向に作用している可能性を示した ('00年薬理学会要旨集 P. 127)。モルモット、マウス、及びヒトの冠動脈平滑筋培養細胞において、ムスカリ受容体内向き  $K^+$ 整流を、Edg-3経由でSPN-1Pが活性化し、SPN-1Pが呼吸困難などを引き起こす迷走神経を刺激している可能性が指摘されている (Molecular Pharmacology, '00, 58, 449)。また、ウサギ洞房細胞の培養において、自発的ペースメーカーの周期をSPN-1Pが伸長する事より、SPN-1Pが心臓の拍動周期に対し負の作用を示している可能性が示唆されている (Pfugers Arch - Eur. J. Physiol. '99, 438, 642)。

【0008】血管内皮細胞に及ぼすSPN-1Pの作用を、血管新生動物モデルを用いて検討した結果、VEGFやFGF-2などの増殖因子による血管新生を、SPN-1PがEdg-1、Edg-3と結合する事によって相乗的に促進させ、Edgがリウマチ、固形がんや糖尿病性網膜症の進行に作用している可能性が指摘されている (Cell '99, p. 301)。

【0009】SPN-1PとEdg受容体の結合によって引き起こされる過剰な炎症や気道のリモデリングの結果、肺炎、慢性閉塞性肺疾患 (COPD: chronic obstructive airway disease)、呼吸器系高血圧が進行する可能性が指摘されている (Pulmonary Pharmacology & Therapeutics, 2000, 13, p. 99)。

【0010】原虫トリパノゾーマの撲滅薬、スラミンが Edg - 3特異的な拮抗性を示し、SPN-1Pと Edgの結合のシグナルを阻止する事が報じられている(J. B. C. '99, 274, 27, p. 18997)。スラミンは動脈硬化病態モデルに治癒的に奏効する事が示されている(Circulation, '99, 100, p. 861, Cardiovascular Res., '94, 28, p. 1166)が、この薬効の機作にEdg拮抗性が絡んでいる可能性が考えられる。

【0011】以上の知見を総合すると、SPN - 1Pが Edg と結合すると、炎症性細胞活性化や血管平滑筋細胞増殖、血行動態悪化など動脈硬化促進的に作用する。また、血管新生を促進し、リウマチ、固体ガン、糖尿病性網膜症の進行の方向に作用する可能性が示されている事になる。即ち、Edgに拮抗する物質が、抗動脈硬化性、抗心臓疾患性などの循環器系疾患性、抗リウマチ性、抗ガン性、抗糖尿病性網膜症性及び呼吸器系疾患性を示す可能性が考えられる。したがって、スフィンゴ脂質類を各種合成し、Edg拮抗活性を有する物質を見出すことはこれらの疾患の治療薬を創製する上で極めて重要である。しかしながら、スフィンゴ脂質類の合成には多くの段階を要するため、これまで構造活性相関研究はほとんどなされていない。

【0012】これまで主に天然型基本骨格として最も多く存在する3位水酸基の立体異性体に相当するD-エリスロ型(2S, 3R体)スフィンゴシンの化学合成法が研究され、多くの報告がなされている。しかしながら、天然型とは立体配置の異なるL-ースレオ型(2S, 3S体)を選択的に合成することは以下に説明するように容易ではなく、また、そのリン酸化体は合成されていなかった。

【0013】これまでの合成例としては不斉アルドール型反応を利用する方法(伊藤ら, Tetrahedron Lett., 1988, Vol. 29, p. 239; E. J. Coreyら, Tetrahedron Lett., 2000, Vol. 41, p. 2765)等が報告されているが、途中の工程で用いる試薬が特殊である、あるいは煩雑な操作を要するなどの問題点があった。また天然エリスロ型の3位水酸基を反転させる方法も知られているが、隣接した4位に二重結合があるため位置異性体を生じやすいなどの問題点があった。

【0014】アミノ酸L-セリンを出発原料としてスレオ型スフィンゴシンを製造する方法も知られている(P. Herold, Helv. Chim. Acta, 1988, Vol. 71, p. 354; I. Van Overmeireら, J. Med. Chem., 1999, Vol. 42, p. 2697)が、この方法ではスレオ型のプロパルギルアルコール類を得てから、三重結合を還元してアルケン(二重結合)化しており、簡便とはいえない。

【0015】アルデヒド化合物に対して直接、アルケニル化剤(アルケニル化金属試薬)を作用させて、保護されたスフィンゴシンの3位水酸基に関する2つの立体異性体、エリスロ体とスレオ体を生成する方法は知られている。しかし、これらの異性体の生成比は金属種、溶

媒、添加する触媒、反応温度等により変化しやすいため選択的に異性体を製造するための条件設定がむずかしく、また、クロマトグラフィー等による異性体の分離が困難である。さらに、エリスロ選択的に得られる方法は知られているが(特開平7-291904号公報、J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1994, p. 1257)、スレオ選択的に得られる方法は知られていない。したがって、スレオ体を立体選択性の高い反応により得る簡便な方法が望まれる。

#### 【0016】

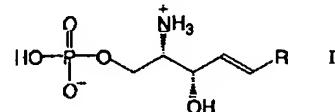
【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、Edg受容体拮抗活性を有する新規なアミノアルコールリン酸化合物、その簡便な製造方法及び利用方法を提供することにある。

#### 【0017】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、スレオ型アミノアルコール化合物はEdg受容体拮抗作用がないにもかかわらず、そのリン酸体である以下の一般式I化合物(以下、「本発明化合物」という)がEdg受容体拮抗作用を有すること、また、その化合物を立体選択性に優れた合成経路により簡便に製造できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0018】本発明は、下記一般式I

#### 【化11】



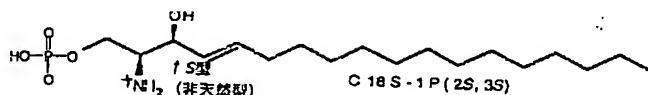
(式中、Rは、置換されてもよい直鎖状または分岐鎖状の $\text{CH}_3\text{C}_n\text{H}_{(2n-2a)}$ -(nは、2から19の間のいづれかの整数であり、mは、不飽和数を表し、0から3の間のいづれかの整数である)または置換されてもよいアリール基である)で表される、スレオ型(2S, 3S)アミノアルコール-1-リン酸化合物またはその製薬学的に許容される塩に関する。

#### 【0019】

【発明の実施の形態】前記一般式Iにおける置換基について説明する。「置換されてもよい $\text{CH}_3\text{C}_n\text{H}_{(2n-2a)}$ 」の置換された $\text{CH}_3\text{C}_n\text{H}_{(2n-2a)}$ とは、例えば、水酸基、ハロゲン原子、炭素数1から10の直鎖でも分岐鎖でもよいアルキル基若しくはアルコキシ基及びアリール基からなる群から選択される1つ以上で置換された $\text{CH}_3\text{C}_n\text{H}_{(2n-2a)}$ をいう。「アリール基」の具体例としては、フェニル基、1-ナフチル基および2-ナフチル基などがあげられる。「置換されてもよいアリール基」の置換されたアリール基とは、例えば、炭素数1から10の直鎖でも分岐鎖でもよいアルキル基若しくはアルコキシ基、ニトロ基及びハロゲン原子からなる群から選択される1つ以上で置換されたアリール基をいう。

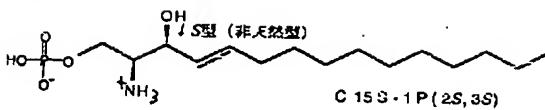
【0020】Rの好ましい態様としては、以下のものがあげられる。nは、好ましくは5-16であり、さらに好ましくは9-12である。mは、好ましくは0-1であり、さらに好ましくは0である。不飽和結合の位置は、nが12のとき、8位が好ましい。

【0021】本発明の式I化合物の特に好ましい化合物を以下にあげる。



【化12】

【化12】



【化13】



【0022】本発明の化合物の塩としては、製薬学的に許容されるものであれば特に制限されず、例えば、メタンスルホン酸塩、トリフロオロメタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩などの低級アルキルスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩などのアリールスルホン酸塩、酢酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、シュウ酸塩、マレイン酸塩などのカルボン酸塩、グリシン塩、アラニン塩、グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩などのアミノ酸塩、ナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩などがあげられる。

【0023】本発明化合物はいずれも内皮分化遺伝子（Edg）受容体拮抗性を示し、Edgに対するSPN-1PなどのEdg受容体作動物質の結合に拮抗し、これらによる細胞内シグナル伝達系を阻止することができる。また、本発明化合物は、これらを医薬の必須成分として使用した場合、医薬の通常の他の成分と配合しても、前記特性が有効に発現することができる。従って、本発明は、本発明化合物を有効成分として含有する、内皮分化遺伝子（Edg）受容体に拮抗する医薬を提供する。また、本発明は、炎症性細胞活性化や血管平滑筋増殖、血行動態悪化、さらに血管新生によって生じる疾患、例えば、循環器系疾患（例えば、動脈硬化、心臓疾患（例えば、心筋梗塞、不整脈））、リウマチ（例えば、慢性関節リウマチ）、がん、糖尿病性網膜症、呼吸器系疾患（例えば、肺炎、慢性閉塞性気道疾患、呼吸器系高血圧）を予防若しくは治療するための上記医薬を提供する。ここで、「循環器系疾患」とは、血液、リンパなどの循環状態が障害され、組織や細胞に障害をおこしている疾患をいい、例としては、動脈硬化性疾患（例えば、アテローム（粥状）硬化症）、心臓疾患（例えば、心筋梗塞、不整脈）がある。ここで、「呼吸器系疾患」とは、気管、気管支、肺などの呼吸器が障害されている疾患及びそれに関連した症候をいい、例としては、喘息

（即時型、遅発型、アレルギー性喘息等）、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、好酸球浸潤、気管支炎（慢性気管支炎等）、気道炎症、肺気腫、肺炎、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、急性呼吸窮迫症候群、呼吸器系高血圧、呼吸困難、疼痛、咳、痰、嘔吐、息切れがある。

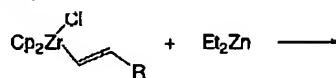
【0024】本発明の化合物を医薬として用いるためには、固体組成物、液体組成物、及びその他の組成物のいずれの形態でもよく、必要に応じて最適のものが選択される。医薬組成物は、本発明の化合物に製薬学的に許容されるキャリヤー、すなわち常用の賦形剤、增量剤、結合剤、崩壊剤、pH調整剤、溶解剤、などを添加し、常用の製剤技術によって、錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、粉剤、液剤、乳剤、懸濁剤、注射剤、などに調製する事ができる。賦形剤、增量剤としては、たとえば、乳糖、ステアリン酸マグネシウム、デンプン、タルク、ゼラチン、寒天、ペクチン、アラビアゴム、オリーブ油、ゴマ油、カカオバター、エチレングリコールなどやその他常用されるものをあげる事ができる。製剤の酸化を防止するためには、酸化防止剤（トコフェロール等）を添加したり、シクロデキストリン等の包接剤で包接したり、ゼラチン等の皮膜でカプセル化することができる。更に、前記化合物を、乳化剤として、リン脂質あるいは非イオン界面活性剤を用いて、O/W型製剤として、特開平6-298642に記載のように調製することができる。乳化剤は、単独あるいは2種以上組み合わせて使用でき、添加量は、適宜でよいが、0.001~10%（W/V）、好ましくは0.01~5%（W/V）である。リン脂質としては、大豆由来リン脂質、卵黄由来リン脂質、リゾレシチン、フォスファチジルコリン（レシチン）、フォスファチジルセリンなどの単独あるいは組み合わせが使用可能である。非界面活性剤としては、分子量500~15000のポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンブロック共重合体（例えば、ブルロニックF-68）、分子量1000~10000のポリアルキレングリコール、分子量1000~20000のポリオキシアルキレン共重合体、硬化ヒマシ油ポリオキシアルキレン誘導体、ヒマシ油ポリオキシアルキレン誘導体、グリセリン脂肪酸エステル、ポリグリセリン脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチ

レンヒマシ油、硬化ヒマシ油、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ショ糖脂肪酸エステルなどの単独あるいは組み合わせが好適に用いられるがこれに限定されない。本発明に於ける各化合物の配合量は医薬を基準として約0.0001～約100mg/kg体重/日を1日1回又は数回に分けて経口又は非経口で投与することができる。この投与量は、疾患の種類、患者の年齢、体重、症状により適宜増減することができる。

【0025】本発明の化合物は、以下の製造法によって製造することができる。式Iの化合物の製造法について、反応原料の調製例を含めて以下に説明する。

(1) 反応原料の調製例

(A) アルケニル化剤の合成



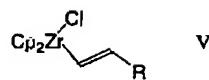
上記反応は、一般式Vで表される有機ジルコニウム化合物に対し、好ましくは当モル量のジアルキル亜鉛を用いて行うことができる。ジアルキル亜鉛としては低級ジアルキル亜鉛（例えば、ジメチル亜鉛またはジエチル亜鉛）が好適である。一般式Vで表される有機ジルコニウム化合物は、公知の方法（J. Schwartzら, Org. Synth., 1992, Vol. 71, p. 83）により、水素化ジルコノセンクロリドと1-アルキンまたはアリールアセチレン類を有機溶媒中で作用させることにより調製される。一般式Vで表される有機ジルコニウム化合物の生成に用いる水素化ジルコノセンクロリドは市販品を用いることができる、また公知の方法（S.L. Buchwaldら, Org. Synth., 1992, Vol. 71, p. 77）により安価な二塩化ジルコノセンから調製することもできる。一般式Vで表される有機ジルコニウム化合物の生成に用いる1-アルキンは炭素数2から22の直鎖状または分岐状のものを用いることができ、また分子内に二重結合が含まれていてもよい。具体的には1-オクチン、1-ドデシン、1-ペントデシン等であり、特に炭素数15の1-ペントデシンの場合は天然物中に最も多いC18スフィンゴシンが得られる。また、アリールアセチレン類を用いることもでき、アリール上に置換基を有してもよい。具体的には、フェニルアセチレン、4-クロロフェニルアセチレン、1-ナフチルアセチレン等である。

【0026】(B) N-保護した(S)-ホルミルオキサゾリジン誘導体の合成

下記式IIIのN-保護した(S)-ホルミルオキサゾ

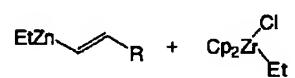
一般式V

【化15】



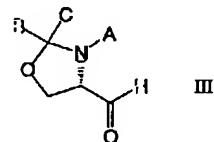
（式中、Rは、置換されてもよい直鎖状または分岐鎖状の $\text{C}_n\text{H}_{(2n-2m)}$ （nは、2から19の間のいずれかの整数であり、mは、不飽和数を表し、0から3の間のいずれかの整数である）または置換されてもよいアリール基であり、Cpはシクロペンタジエニル基を表す）で表される有機ジルコニウム化合物に、ジアルキル亜鉛を以下のように作用させてアルケニル化剤を調製する。

【化16】



リジン誘導体は従来法で合成することができ、例えば、(S)-セリンからGarnerらの方法（J. Org. Chem., 1987, Vol. 52, 2361, Org. Synth., 1991, Vol. 70, p. 18）によって合成することができ、また市販品を用いることもできる。

【化17】

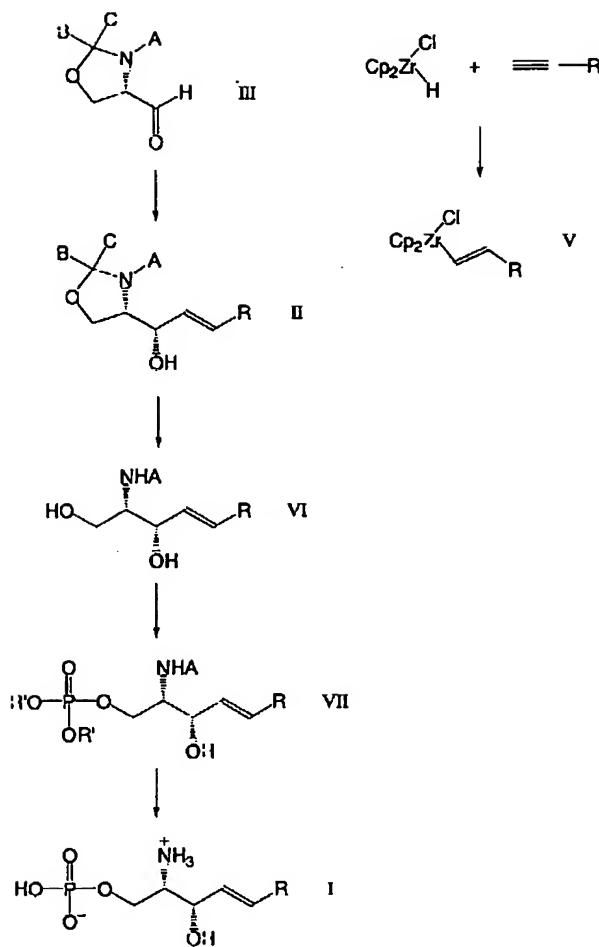


（式中AはNの保護基であり、B及びCはアルキル基（例えば、メチル基、エチル基など）または、B及びCはこれらが結合する炭素原子と一緒にになって環状アルキル基（例えば、シクロペンチル基、シクロヘキシル基など）を形成してもよい）ここで、Nの保護基Aとしては、例えば、ベンジルオキシカルボニル（Z）、t-ブロトキシカルボニル（Boc）、t-アミルオキシカルボニル（Aoc）、イソボニルオキシカルボニル、p-メトキシベンジルオキシカルボニル、2-クロルベンジルオキシカルボニル、アダマンチルオキシカルボニル、などの基が挙げられる。好ましくは、Bocが用いられる。

【0027】(2) 式Iの化合物の合成

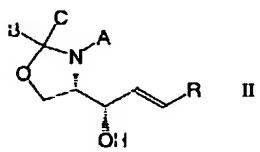
式Iの化合物の合成スキームを以下に示す。

【化18】



【0028】第1工程：上記(1)(A)で得たアルケニル化剤と、上記(1)(B)で得た式IIIのN-保護した(S)-ホルミルオキサゾリジン誘導体とを反応させて、式IIのスレオ体を選択的に得る。

【化19】



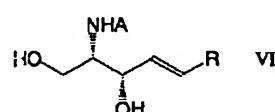
上記反応溶媒としては、スレオ体を選択的に得るために塩化メチレンなどのハロゲン化炭化水素が好適である。反応温度は-30~30°C、特に-20~0°Cが好ましい。反応時間は数時間程度で十分である。これにより天然型と水酸基の立体配置が異なるスレオ体IIが選択的(スレオ/エリスロ=9/1以上)に得られる。

【0029】次に、式II化合物に対し、下記に示す第2~4工程に対応する、①アセタール型保護基の除去、②1級水酸基の選択的リン酸エステル化、③全保護基の除去、の3工程の順序で行うことによりスレオ体を得る簡便な製造法が本発明により確立された。以下に詳しく説明する。なお、特表平8-500816号公報、Bioorg. Me

d. Chem. Lett., 1992, Vol. 2, p. 973記載のエリスロ体を製造する方法と同様の方法を用いることにより化合物IIからスレオ型式Iを製造することができるが、この方法では2級水酸基の保護を要するため工程であり、各工程間でクロマトグラフィーによる精製を要し、操作が極めて煩雑であるので、下記の方法のほうが簡便である。

【0030】第2工程：化合物IIのオキサゾリンを開環してアセタール型保護基を除去し、一般式VI

【化20】

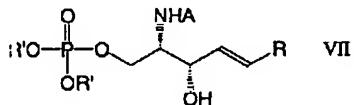


(式中のR及びAは前記と同じ)で表されるアミノ基が保護されたアルコール化合物を得る。反応は溶媒中で塩酸、p-トルエンスルホン酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、強酸性イオン交換樹脂等の酸を用いて、-20~100°Cにおいて、数十分から数十時間で行うことができる。ただし、アミノの保護基が除去されないような反応条件を選ぶことが重要である。約90%酢酸水溶液中で約50°Cに加熱して行うのが特に好ましく、数時間で反応が完

了する。

【0031】第3工程： 第2工程で得られたアミノ基が保護されたアルコール化合物（化合物V I）から下記の1-リン酸類縁体（化合物V I I）へ変換する。

【化21】



（式中R及びAは前記と同じ、R'は低級アルキル基（例えば、メチル基又はエチル基）である）

上記反応は、化合物V Iの2つの水酸基のうち1級水酸基を選択的に反応させるために有効な公知のリン酸化剤を用いて行うことができる。最も簡便で好ましい方法は、以下に詳細を説明する、A. Bielawskaらにより報告された方法（Tetrahedron Lett., 2000, Vol. 41, p. 7821）である。なお、選択的リン酸化法としてホスホロアミダイト法も提案されている（A. Boumendjelら, J. Lipid. Res., 1994, Vol. 35, p. 2305）が、リン試薬を調製する必要があること、酸化の工程が必要であるので、下記方法の方が好ましい。A. Bielawskaらの方法によれば、化合物V Iに対して亜リン酸トリアルキルと四臭化炭素を有機塩基（例えば、ピリジン）中で作用させる。リン酸化剤としては亜リン酸トリメチルまたは亜リン酸トリエチルが好適であり、使用量は化合物V Iに対し1～3当量で十分である。また四臭化炭素の使用量もV Iに対し1～3当量が好適である。反応は、-20℃～50℃、好ましくは0℃～室温で、数十分間から十数時間で行うことができる。

【0032】第4工程： 化合物V I Iのアミノ基及びリン酸基の各保護基を除去する。第4工程の反応は溶媒中、酸性物質を作用させて行うことができる。酸性物質としては、臭化トリメチルシラン、ヨウ化トリメチルシラン、又は塩化トリメチルシランとヨウ化ナトリウムの組み合わせ等が好適であり、使用量はV I Iに対し3～10当量、特に5～6当量が好適である。溶媒としては塩化メチレンなどのハロゲン化炭化水素が好適である。反応温度は、室温～40℃が好ましい。また、リン酸基上の保護基が、用いる酸性物質によって他の基（例えば、トリメチルシリル（TMS）基）に変換される場合には、変換された基は、反応溶媒を留去した後、反応液を酸性にし、加水分解することにより、除去することができる。最後に、濃縮後、揮発性酸性物質を共沸留去し再結晶（例えば、THF-水混合溶媒等から）することにより、純粋な化合物Iを得ることができる。結晶が析出しづらい場合は、シリカゲルクロマトグラフィーによる精製を行い、必要があればさらに再結晶を行う。

【0033】

【実施例】本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、これは本発明の技術範囲を限定するものではな

い。

（実施例1）スレオ-C15-スフィンゴシン-1-リン酸（化合物Iにおいて、R=n-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>）の合成

1. スレオ-C15-N-Boc-N,10-イソプロピリデンースフィンゴシン（化合物I IにおいてR=n-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>、A=Boc、B=CH<sub>3</sub>、C=CH<sub>3</sub>）の合成

アルゴン雰囲気下、水素化塩化ジルコノセン490mg (1.8 mmol)を塩化メチレン2mlに懸濁させ、氷冷しながら、1-ドデシン（R=n-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>）310 mg (1.8 mmol)の塩化メチレン溶液2 mlを加え、室温下1時間攪拌して化合物Vを調製した。この反応液を-20℃に冷却した後、ジエチル亜鉛の1.0 Mヘキサン溶液1.8 ml (1.8 mmol)を加え、約10分間攪拌した。そこへアルデヒド化合物I I I (A=Boc、B=CH<sub>3</sub>、C=CH<sub>3</sub>) 118 mg (1.0 mmol)の塩化メチレン溶液2 mlを加え、-20～0℃で3時間攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、酢酸エチルを加えてしばらく攪拌した。生じた沈殿を沪過し、酢酸エチルにて洗浄した。層を分離し、有機層を飽和食塩水で洗浄した後、水層をまとめて酢酸エチルで2回抽出した。有機層をまとめて無水硫酸ナトリウムを加えて乾燥し、沪過・濃縮乾固を行うと淡黄色オイルが600mg残った。これをシリカゲルクロマトグラフィー（ヘキサン/酢酸エチル=9:1→6:1→4:1）で精製することにより標題化合物を無色油状物質として350 mg (収率88%) 得た。

[(α)<sub>D</sub>] <sub>D</sub> -41.4° (c 1.26, CHCl<sub>3</sub>)

<sup>1</sup>H-NMR (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, 80 °C) : δ (ppm) 0.89 (3H, t, J = 6.6 Hz), 1.28 (16H, s), 1.40 (9H, s), 1.45 (3H, s), 1.64 (3H, s), 1.99 (2H, q, J = 6.7 Hz), 3.69 (1H, d, J = 6.3, 9.3 Hz), 3.90 (1H, dd, J = 1.8, 9.3 Hz), 3.95 (1H, dt, J = 1.5, 6.6 Hz), 4.41 (1H, t, J = 7.0 Hz), 5.53 (1H, dd, J = 7.1, 15.4 Hz), 5.71 (1H, dt, J = 6.7, 15.4 Hz), m/z (CI): C<sub>23</sub>H<sub>44</sub>NO<sub>4</sub> (M+H)<sup>+</sup>としての計算値, 398.3200, 実測値 398.3212

【0034】2. スレオ-C15-Boc-スフィンゴシン（化合物V IにおいてR=n-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>、A=Boc）の合成

1で得られた化合物95mg (0.24 mmol)を酢酸0.9mlと水0.1mlに溶かし、50℃で5時間攪拌した。溶媒留去後、ヘプタン1mlを加えて濃縮乾固すると淡黄色オイルが残った。これをシリカゲルクロマトグラフィー（ヘキサン/酢酸エチル=2:1→1:1）で精製することにより標題化合物を無色油状物質として70 mg (収率82%) 得た。

[(α)<sub>D</sub>] <sub>D</sub> -1.6° (c 1.78, CHCl<sub>3</sub>)

<sup>1</sup>H-NMR (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm) 0.87 (3H, t, J = 6.7 Hz), 1.25 (14H, s), 1.34 (2H, m), 1.43 (9H, s), 2.02 (2H, q, J = 6.7 Hz), 2.82 (1H, ブロード), 3.61 (1H, m), 3.77 (2H, d-様, 3.7 Hz), 4.33 (1H, m), 5.18 (1H, d, J = 7.6 Hz), 5.50 (1H, dd, J = 6.

3, 15.6 Hz), 5.74 (1H, dt, J = 6.7, 15.4 Hz)  
<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) 14.1, 22.6, 28.3, 28.4, 29.0, 29.2, 29.3, 29.5, 29.6, 31.9, 32.3, 55.5, 64.2, 73.4, 79.7, 128.9, 134.0, 156.6  
元素分析値 (C<sub>20</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>4</sub>として)

実測値 (%) : C 67.08; H 11.15; N 3.87  
計算値 (%) : C 67.19; H 10.99; N 3.92

【0035】3. スレオ-C15-スフィンゴシン-1-リン酸エステル (化合物V I IにおいてR=n-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>、A=H、R'=C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>) の合成  
窒素雰囲気下、2で得られた化合物65 mg (0.18 mmol) と四臭化炭素135 mg (0.4 mmol) をピリジン1 mLに溶かし、冷却しながら亜リン酸トリメチル50 mg (0.4 mmol) を加え、室温下5時間攪拌した。そこへ飽和塩化アンモニウム水溶液と酢酸エチルを加えてしばらく攪拌した後、層を分離した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、水層をまとめて酢酸エチルで2回抽出した。有機層をまとめて無水硫酸ナトリウムを加えて乾燥し、沪過・濃縮乾固を行うと淡黄色オイルが残った。これをシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル=1:1→1:2) で精製することにより標題化合物が無色油状物として59 mg (収率70%) 得られ、出発物質 (2で得られた化合物) が9 mg (14%) 回収された。

[( $\alpha$ )<sub>D</sub>] = -5.4° (c 1.4, CHCl<sub>3</sub>)  
<sup>1</sup>H-NMR (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm) 0.87 (3H, t, J = 6.6 Hz), 1.25 (14H, s), 1.33 (2H, m), 1.42 (9H, s), 2.02 (2H, q, J = 6.7 Hz), 3.77 (3H, d, J = 11.2 Hz), 3.78 (3H, d, J = 11.2 Hz), 3.79 (1H, m), 4.09 (2H, m), 4.33 (1H, m), 5.03 (d, J = 9.0 Hz), 5.46 (1H, dd, J = 6.0, 15.4 Hz), 5.76 (1H, dt, J = 6.7, 15.4 Hz)  
<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) 14.1, 22.7, 28.3, 29.1, 29.2, 29.3, 29.5, 29.57, 29.61, 29.7, 31.9, 32.3, 54.0, 54.4, 54.7, 66.1, 70.0, 79.7, 128.4, 134.0, 156.0 m/z (CI): C<sub>22</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>7</sub>P (M+H)<sup>+</sup>としての計算値, 466.2863, 実測値, 466.2855

【0036】4. スレオ-C15-スフィンゴシン-1-リン酸 (化合物IにおいてR=n-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>) の合成  
3で得られた化合物23 mg (0.05 mmol) を塩化メチレン1 mLに溶かして冷却し、臭化トリメチルシラン50 micro L (0.3 mmol) を加え、室温下3時間攪拌した。この溶液を濃縮後、ジオキサン0.5 mLと水0.5 mLを加え、約2時間攪拌した。これを濃縮し、メタノール1 mLを加え再び濃縮した。残さ20 mgをTHF-水 (2:1) から再結晶することにより標題化合物を無色固体として12 mg (収率71%) 得た。

<sup>1</sup>H-NMR (270 MHz, CD<sub>3</sub>OD-CD<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>D, 3:1) : δ (ppm) 0.87 (3H, t, J = 6.7 Hz), 1.27 (14H, s), 1.39 (2H, m), 2.07 (2H, q, J = 6.6 Hz), 3.41 (1H, m), 3.92 (1H, dd, J = 7.0, 12.1 Hz), 4.06 (1H, m), 4.17 (1H, t,

J = 7.8 Hz), 5.45 (1H, dd, J = 7.7, 15.3 Hz), 5.86 (1H, dt, J = 6.6, 15.1 Hz) m/z (CI): C<sub>15</sub>H<sub>34</sub>NO<sub>5</sub>P (M+H)<sup>+</sup>としての計算値, 338.2026, 実測値, 338.2051.

【0037】(実施例2) スレオ-C18-スフィンゴシン-1-リン酸 (化合物Iにおいて、R=n-C<sub>13</sub>H<sub>27</sub>) の合成

1. スレオ-C18-N-Boc-N,10-イソプロピリデンースフィンゴシン (化合物I Iにおいて、R=n-C<sub>13</sub>H<sub>27</sub>, A = Boc, B = CH<sub>3</sub>, C = CH<sub>3</sub>) の合成

実施例1の1と同様に合成した。無色油状物。収率86%  
[( $\alpha$ )<sub>D</sub>] = -37.8° (c 0.84, CHCl<sub>3</sub>)

<sup>1</sup>H-NMR (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, 80 °C) : δ (ppm) 0.89 (3H, t, J = 6.7 Hz), 1.31 (22H, s), 1.40 (9H, s), 1.45 (3H, s), 1.64 (3H, s), 1.99 (2H, q, J = 6.8 Hz), 3.69 (1H, dd, J = 6.3, 9.0 Hz), 3.90 (1H, dd, J = 1.5, 9.3 Hz), 3.95 (1H, dt, J = 1.5, 6.6 Hz), 4.41 (1H, t, J = 7.0 Hz), 5.53 (1H, dd, J = 6.8, 15.3 Hz), 5.71 (1H, dt, J = 6.7, 15.4 Hz),

<sup>13</sup>C-NMR (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>) 14.1, 23.0, 24.3, 27.1, 28.4, 28.5, 29.5, 29.6, 29.7, 29.9, 30.1, 32.3, 32.6, 62.5, 64.8, 74.8, 80.3, 94.6, 130.6, 134.0, 156.6 m/z (CI): C<sub>26</sub>H<sub>50</sub>NO<sub>4</sub> (M+H)<sup>+</sup>としての計算値: 440.3670, 実測値: 440.3652

【0038】2. スレオ-C18-Boc-スフィンゴシン (化合物V Iにおいて、R=n-C<sub>13</sub>H<sub>27</sub>, A = Boc) の合成

実施例1の2と同様に合成した。無色固体。収率80%  
融点: 58~60°C

[( $\alpha$ )<sub>D</sub>] = -0.7° (c 1.6, CHCl<sub>3</sub>)

<sup>1</sup>H-NMR (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm) 0.87 (3H, t, J = 6.7 Hz), 1.25 (20H, s), 1.34 (2H, m), 1.44 (9H, s), 2.03 (2H, q, J = 6.8 Hz), 2.60 (1H, ブロード), 3.61 (1H, m), 3.78 (2H, d-様, 3.7 Hz), 4.34 (1H, dd, J = 2.9, 6.1 Hz), 5.18 (1H, d, J = 7.6 Hz), 5.50 (1H, dd, J = 6.5, 15.5 Hz), 5.74 (1H, dt, J = 6.8, 15.4 Hz)

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) 14.1, 22.7, 28.3, 28.4, 29.0, 29.2, 29.3, 29.5, 29.58, 29.63, 29.7, 31.9, 32.3, 55.5, 64.3, 73.4, 79.7, 128.9, 134.0, 156.6

元素分析値 (C<sub>23</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>4</sub>として)

実測値 (%) : C 69.22; H 11.45; N 3.47

計算値 (%) : C 69.13; H 11.35; N 3.51

【0039】3. スレオ-C18-スフィンゴシン-1-リン酸エステル (化合物V I Iにおいて、R=n-C<sub>13</sub>H<sub>27</sub>, A=H、R'=C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>) の合成

実施例1の3と同様に合成した。無色油状物。収率65%

[( $\alpha$ )<sub>D</sub>] = -3.5° (c 1.0, CHCl<sub>3</sub>)

<sup>1</sup>H-NMR (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm) 0.87 (3H, t, J = 6.6 Hz), 1.25 (22H, s), 1.42 (9H, s), 2.02 (2H, q, J = 6.7 Hz), 3.77 (3H, d, J = 11.2 Hz), 3.78 (3

H, d, J = 11.2 Hz), 3.79 (1H, m), 4.09 (2H, m), 4.33 (1H, m), 5.03 (d, J = 9.0 Hz), 5.46 (1H, dd, J = 6.0, 15.4 Hz), 5.76 (1H, dt, J = 6.7, 15.4 Hz)  
<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) 14.1, 22.7, 28.3, 29.1, 29.2, 29.3, 29.4, 29.5, 29.58, 29.63, 29.7, 31.9, 32.3, 54.3, 54.5, 54.6, 66.2, 70.1, 79.7, 128.4, 134.0, 156.0 m/z (CI): C<sub>25</sub>H<sub>51</sub>NO<sub>7</sub>P (M+H)<sup>+</sup>としての計算値, 508.3333, 実測値, 508.3335

【0040】4. スレオ-C18-スフィンゴシン-1-リン酸 (化合物Iにおいて、R=n-C<sub>13</sub>H<sub>27</sub>) の合成  
 実施例1の4と同様に合成した。無色固体。収率62%  
<sup>1</sup>H-NMR (270 MHz, CD<sub>3</sub>OD-CD<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>D, 3:1) : δ (ppm) 0.87 (3H, t, J = 6.6 Hz), 1.26 (20H, s), 1.38 (2H, m), 2.06 (2H, q, J = 6.6 Hz), 3.37 (1H, m), 3.95 (1H, dd, J = 7.0, 12.1 Hz), 4.07 (1H, m), 4.19 (1H, t, J = 7.8 Hz), 5.44 (1H, dd, J = 7.7, 15.3 Hz), 5.86 (1H, dt, J = 6.6, 15.2 Hz)  
 元素分析値 (C<sub>18</sub>H<sub>38</sub>NO<sub>5</sub>Pとして)  
 実測値 (%) : C 65.24; H 8.03; N 4.67  
 計算値 (%) : C 65.51; H 7.90; N 4.77

【0041】(実施例3) スレオ-2-アミノ-3-シンナミル-1, 3-ジオール-1-リン酸 (化合物Iにおいて、R=C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>) の合成  
 1. スレオ-シンナミルアルコール誘導体 (化合物I Iにおいて、R=C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>、A=Boc、B=CH<sub>3</sub>、C=CH<sub>3</sub>) の合成  
 フェニルアセチレン103 mg (1.0 mmol)、水素化塩化ジルコノセン265 mg (1.0 mmol)、ジエチル亜鉛1.0 Mヘキサン溶液0.9 mL (0.9 mmol)、アルデヒド化合物I I I (A=Boc、B=CH<sub>3</sub>、C=CH<sub>3</sub>) 135 mg (0.6 mmol)を用いて実施例1の1と同様に合成したところ、標題化合物が無色油状物質として180 mg (収率92%) 得られた。

【0042】2. シンナミル型スレオ-Bocアミノアルコール誘導体 (化合物V Iにおいて、R=C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>、A=Boc) の合成  
 実施例1の2と同様に合成した。化合物I I (R=C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>) 84 mg (0.25 mmol)から標題化合物が無色固体として66 mg (収率89%) 得られた。

融点: 78~80°C

〔α〕<sub>D</sub> +11.3° (c 1.32, CHCl<sub>3</sub>)

<sup>1</sup>H-NMR (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm) 1.43 (9H, s), 2.03 (2H, q, J = 6.8 Hz), 3.75 (1H, ブロード), 3.79 (1H, m), 3.85 (2H, ), 4.64 (1H, m), 5.37 (1H, d, J = 8.3 Hz), 6.27 (1H, dd, J = 5.9, 15.9 Hz), 6.69 (1H, d, J = 15.9 Hz), 7.22-7.42 (5H, m)  
<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) 28.2, 55.6, 63.5, 72.6, 79.9, 126.5 (2C), 127.7, 128.5 (2C), 128.8, 131.4, 136.5, 156.6

元素分析値 (C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub>として)

実測値 (%) : C 65.24; H 8.03; N 4.67

計算値 (%) : C 65.51; H 7.90; N 4.77

【0043】3. シンナミル型スレオ-Bocアミノアルコールリン酸エステル (化合物V I Iにおいて、R=C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>、A=H、R'=CH<sub>3</sub>) の合成

実施例1の3と同様に合成した。無色油状物。収率65%  
 〔α〕<sub>D</sub> +0.9° (c 0.9, CHCl<sub>3</sub>)

<sup>1</sup>H-NMR (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm) 1.37 (9H, s), 3.76 (3H, d, J = 11.2 Hz), 3.78 (3H, d, J = 11.1 Hz), 3.93 (1H, m), 4.15 (2H, m), 4.58 (1H, m), 5.12 (d, J = 8.3 Hz), 6.20 (1H, dd, J = 5.4, 16.0 Hz), 6.70 (1H, d, J = 16.0 Hz), 7.18-7.40 (5H, m)  
<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) 28.2, 54.3, 54.5, 54.6, 66.9, 79.8, 126.5 (2C), 127.6, 128.3, 128.5 (2C), 131.6, 136.6, 156.0 m/z (CI): C<sub>18</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>7</sub>P (M+H)<sup>+</sup>としての計算値: 402.1611, 実測値: 402.1632

【0044】4. スレオ-2-アミノ-3-シンナミル-1, 3-ジオール-1-リン酸 (化合物Iにおいて、R=C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>) の合成

実施例1の4と同様に合成した。反応後の濃縮物からは結晶化できなかったため、シリカゲルクロマトグラフィー (展開溶媒: n-ブタノール/酢酸/水=6:1:1) により精製した。無色固体。収率41%

<sup>1</sup>H-NMR (270 MHz, CD<sub>3</sub>OD-CD<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>D, 4:1) : δ (ppm) 3.65 (1H, m), 4.03 (1H, m), 4.14 (2H, m), 6.22 (1H, d, d, J = 6.0, 16.0 Hz), 6.80 (1H, d, J = 16.0 Hz), 7.22-7.40 (5H, m)

【0045】(実施例4) Edg受容体応答性試験

HL 60細胞を細胞銀行より入手し、BBRC '98, 263, p. 253記載の方法に従って、10%ウシ胎児血清を含有したRPM I -1640培地 (Gibco) を用いて約50継代培養し、Edg受容体を細胞表面に発現している前骨髄芽腫細胞株 HL60を調製した。このEdg受容体を細胞表面に発現しているHL 60を用いて、被験物質の細胞応答性を検討した。細胞応答の指標として、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇を測定した。なお、HL60細胞表面上のEdg受容体は、SPN-1 Pと結合すると、Gタンパク質をリン酸化し、IP<sub>3</sub>キナーゼを活性化した後に細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇する事が報告されている (FEBS Letter '96, 379, p. 260, BBRC '98, 253, p.

253)ので、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度がEdg受容体応答性の指標となる。 $\text{Ca}^{2+}$ キレート試薬Fura - 2 AMをHL 60細胞に取り込ませた。石英製セル内に細胞懸濁液 1.2 mlを充填し、蛍光光度計 LS - 50 B (バーキンエルマー、細胞測定用)に装着し、0.5秒毎に励起波長を340 nm ( $\text{Ca}^{2+}$ をキレートしたFura - 2を励起)と380 nm (未反応Fura - 2を励起)に交互に切り替え、510 nmの蛍光光度を測定した。被験物質(実施例1、2または3の化合物)を30  $\mu\text{M}$ 終濃度で、マイクロシリジンを用いて加えた後蛍光光度を追跡して $\text{Ca}^{2+}$ が増加するかどうか検討した。また、被験物質添加後に1  $\mu\text{M}$ のSPN - 1Pを追加した際、 $\text{Ca}^{2+}$ が増加するかどうか確認し、各物質のSPN - 1P拮抗性について検討した。実施例1または2の化合物を添加した後、SPN - 1P追加による細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度増加が阻止された事より、これらの物質がEdg拮抗性である可能性が示唆された。次に、拮抗の可能性が示唆された実施例1、2または3の化合物による細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 増加阻止作用の用量依存性を検討した。対照として、既に拮抗作用が確認されているスラミンを用いた。実験手法は、各濃度の被験物質添加後 SPN - 1P (1  $\mu\text{M}$ )を添加した以外は上述と同様に行った。また、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度増加は、陰性対照群(薬剤無添加)での $\text{Ca}^{2+}$ 増加濃度に対する相対値として、 $\text{Ca}^{2+}$ 増加濃度%で評価した。その結果、実施例1の化合物が0.003~0.03  $\mu\text{M}$ 濃度において、実施例2の化合物および実施例3の化合物が0.01~0.1  $\mu\text{M}$ 濃度において、用量依存的にSPN - 1Pによる $\text{Ca}^{2+}$ 濃度増加を抑制した。その結果を図1に示す。また、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 増加の50%阻止濃度( $\text{ED}_{50}$ 値)が、実施例1の化合物で $0.015 \pm 0.007 \mu\text{M}$ 、実施例2の化合物で $0.030 \pm 0.002 \mu\text{M}$ 、実施例3の化合物で $0.037 \pm 0.014 \mu\text{M}$ であったが、既にEdg拮抗性が報告されているスラミンの $\text{ED}_{50}$ 値 $1.8 \pm 0.1 \mu\text{M}$ と比較すると実施例1の化合物の作用強度は凡そ100倍、実施例2の化合物の作用強度は凡そ60倍強かった。その結果を表1に示す。

【表1】

Ca<sup>2+</sup>増加の 50%阻止点

物質	ED <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
陽性対照	スラミン 1.8±0.1
実施例 1	0.015±0.007
実施例 2	0.030±0.002
実施例 3	0.037±0.014

【0046】(実施例5) 血管平滑筋に及ぼす作用被験物質について血管平滑筋増殖への作用を検討した。動脈硬化症の進行に伴って血管平滑筋細胞が収縮型から合成型に形質転換し、炎症性サイトカインを分泌しながら

ら血管平滑筋細胞が増殖し動脈硬化巣が進展すると考えられている(ロスの仮説)。血管平滑筋細胞の表面にはEdg受容体が発現している事が報告されており( The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics' 00, Vol. 58, 449頁)、SPN - 1Pと同様、Edg受容体に作動するスフィンゴシルフォスフォリルコリンに応答して血管平滑筋細胞が増殖する事が報じられている( The American Physiological Society 98, C1255頁)。従って、今回、実施例1の化合物による血管平滑筋増殖への作用を検討した。陽性対照として、Edg受容体拮抗性が確認されているスラミンを用いた。ラット頸動脈内膜をバルーニングによって擦過し、2週間後にエクスプラント法(Explant culture)によって調製した血管平滑筋細胞を10%牛胎児血清を含んだDMEM培地(Gibco)にて培養し、数回継代し安定させた後、 $5 \times 10^3$ 細胞 /  $\text{cm}^2$ の細胞密度に蒔種し実験に用いた。増殖因子スフィンゴシルフォスフォリルコリン(10  $\mu\text{M}$ )と併せて実施例1の化合物、或いはスラミンを上述細胞に添加し、24時間後、BrdUアッセイ(Science '82, 218, p.474)によって細胞密度を測定した。その結果、実施例1の化合物は0.3~3  $\mu\text{M}$ 濃度において、用量依存的に血管平滑筋細胞増殖を抑制した。なお、陽性対照として用いたスラミンについては30、100  $\mu\text{M}$ 濃度において血管平滑筋細胞増殖を抑制した。その結果を図2に示す。

#### 【0047】(実施例6) $^3\text{H}$ -SPN - 1Pを用いた競合実験

実施例4と同じEdg受容体を細胞表面に発現している前骨髄芽腫細胞株HL 60を用いた。HL 60細胞を遠心分離によって回収後 F- 12培地(4°C保存、10 ml)に懸濁し、RI実験室に搬入した。細胞懸濁液 200  $\mu\text{M}$  (1  $\times 10^6$  細胞/ml F- 12)に、終濃度 1 nMの $^3\text{H}$ -SPN - 1P(15  $\mu\text{Ci}/1 \text{mM}$ )と終濃度 100 nMの非標識化合物(実施例1化合物、実施例2化合物、実施例3化合物)を加え、4°Cにて30分間(時々攪拌して)結合試験を行った。7分間 12,000 rpmにて遠心分離後、上澄を素早く(細胞ペレットを傷付けない様に)マイクロビッターで捨て去り、細胞ペレットをレディソルブ(ベックマン)1.5 mlで懸濁後バイアルに移し液体シンチレーションカウンター L 2100(ベックマン)で放射活性を測定した。その結果を以下の表2に示す。この結果より、SPN - 1Pと同様、実施例1化合物、実施例2化合物、実施例3の化合物が、 $^3\text{H}$ -SPN - 1Pに競合した事より、これらの物質がEdgと特異的に結合していると考えられた。

【表2】

物質	非標識物質(100 nM)	結合した $^3\text{H}$ -SPN-1P (DPM)
陰性対照	—	1323 $\pm$ 81
陽性対照	SPN-1P	975 $\pm$ 45*
	実施例1化合物	1023 $\pm$ 66*
	実施例2化合物	843 $\pm$ 127*
	実施例3化合物	1102 $\pm$ 379*

(\*、p≤0.05) \* : 陰性対照に対し、危険率p≤5%にて有意に抑制

#### 【0048】(実施例7) 疑似血管モデルを用いた抗炎症試験

体内の損傷部位で、露出を受けたコラーゲン(細胞外マトリックス)が損傷シグナルとして標的になり、血小板が凝集してくるが、凝集して活性化した血小板から放出されるPDGFなどの炎症性サイトカインは、炎症を進行させ、また重度の炎症は循環器の恒常性を破綻させ、動脈硬化を進行させると考えられている。SPN-1Pも、PDGFと同様の作用を有すると考えられている。そこで、SPN-1Pを炎症惹起剤として用いて、疑似血管in vitroモデルを確立し、そのモデルを用いて、本発明化合物が抗炎症作用を示すかどうか、それによって循環器の恒常性を維持し、病態を改善する方向に作用する可能性があるか否か検討した。

#### 【0049】(1) 疑似血管in vitro炎症モデルの確立

3  $\mu\text{m}$ 孔の多孔膜により上室と下室とに区切られたトランスウェルを用い、トランスウェル上室底面の孔膜上に一層のウシ内皮細胞を培養し、トランスウェル上室に蛍光標識した好中球浮遊液を加え、下室にSPN-1Pを終濃度0.1~10 microMとなるように懸濁した。即ち、トランスウェルの上室と下室は内皮層を隔てて隔離され、上室が血管内部、下室が血管外の炎症部に対応する疑似血管in vitro炎症モデルとなっている。上室から内皮層を潜り抜けて下室へ透過した好中球数、及び、内皮層に粘着した好中球数を530 nmの蛍光強度より測定し、相対的好中球数を以下のように算出した。

相対的好中球数%=[実験群での好中球(透過及び粘着)数]/[コントロールでの好中球(透過及び粘着)数]  $\times 100$

(コントロールは、SPN-1P無添加の場合である)。

その結果、SPN-1P 10 microMにて、有意に好中球の内皮層透過、及び、粘着が促進を受けた(図3参照)。つまり、SPN-1Pが炎症惹起物質として作用していると考えられた。

#### 【0050】(2) 炎症細胞-血管内皮細胞相互作用に及ぼす本発明化合物の作用

次に、上記疑似血管in vitro炎症モデルを用いて、好中球と血管内皮細胞との相互作用に、実施例2の化合物がどのように影響するか検討した。即ち、トランスウェル下室に実施例2の化合物を0.01~1 microMで添加し、SPN-1P 10 micro Mを下室に入れて炎症を惹起した。コントロールは、薬剤無添加で上記と同様に炎症を惹起したもの用いた。内皮層に粘着した好中球数、或いは内皮層を抜け下室へ透過した好中球数を530 nmの蛍光強度より測定し、相対的好中球数を上記式より算出した。その結果を図4に示す。図に示されるように、実施例2の化合物は、好中球透過及び粘着を抑制した。従って、疑似血管in vitroモデルに於て、SPN-1Pを炎症惹起剤として用いた場合、実施例2の化合物は抗炎症的に作用する事より、循環器の恒常性を維持し、病態を改善する方向に作用する可能性が考えられる。

#### 【0051】

【発明の効果】本発明の化合物は、優れたEdg受容体拮抗作用を示し、本発明の化合物を有効成分とする医薬は循環器系疾患(例えば、動脈硬化症、心臓疾患)、がん、リウマチ、糖尿病性網膜症、呼吸器系疾患に対して優れた予防または治療効果を示す。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の化合物が用量依存的にEdg拮抗性を示すグラフである(スラミン:対照)。

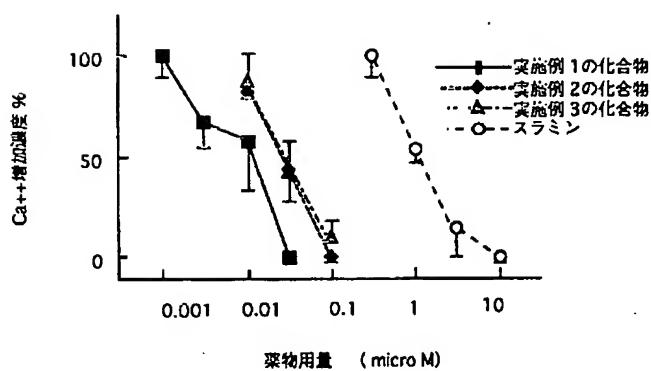
【図2】本発明の化合物が用量依存的に血管平滑筋細胞増殖の抑制作用を示すグラフである(スラミン:対照)。図中、白四角は、被験物質をいれない場合のデータであり、また、\* : 陰性対照に対し、危険率p≤5%にて有意に抑制、\*\* : 陰性対照に対し、危険率p≤1%にて有意に抑制を示す。

【図3】内皮細胞-好中球相互作用に及ぼすSPN-1Pの作用を示す。

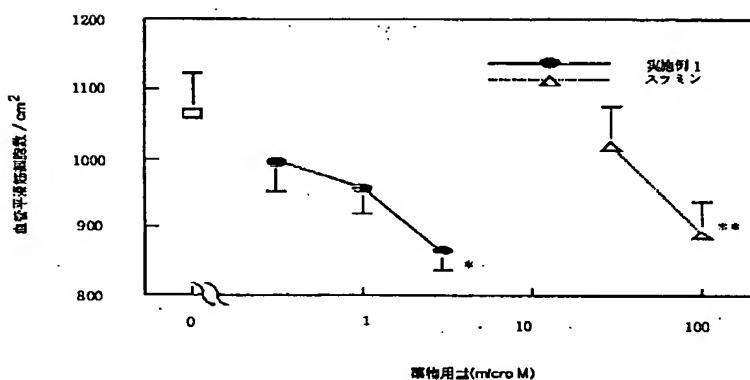
\* : 薬剤無添加のコントロールと比較して危険率5%にて有意に促進

【図4】本発明化合物が好中球の血管内皮細胞への移動に抑制的に作用していることを示すグラフである。

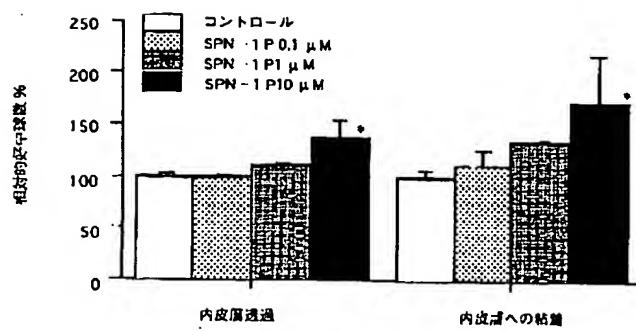
【図1】



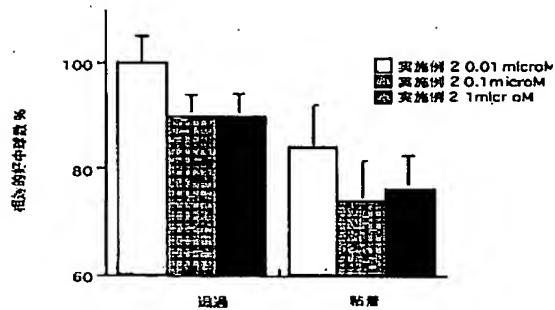
【図2】



【図3】



【図4】



## フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7	識別記号	F I	(参考)
A 6 1 P 11/00		A 6 1 P 11/00	
27/02		27/02	
29/00	1 0 1	29/00	1 0 1
35/00		35/00	
(72)発明者 西川 正純	茨城県つくば市和台16-2 マルハ株式会社中央研究所内	F ターム(参考) 4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 DA34 MA01 MA04 NA14 ZA33 ZA36 ZA37 ZA40 ZA45 ZA59 ZA96 ZB15 ZB26	
(72)発明者 村上 梢一	茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所 つくばセンター内	4H050 AA01 AA02 AA03 AB20 AB23 AB25 AB27 AB28 AC40 AC80 BD70	